7-AAD 细胞活力检测试剂盒

Cat NO : IMFP-D017

产品简介

7-AAD 细胞活力检测试剂盒(7-AAD Cell Viability Assay Kit)是一种基于远红荧光探针 7-AAD (7-aminoactinomycin D)特异性染色细胞膜丧失完整性的坏死细胞的特性开发的能够特异地对坏死细胞的细胞核进行染色从而检测细胞坏死的试剂盒。本试剂盒可与Annexin V-FITC/EGFP/PE、Calcein AM 等联用而用于细胞凋亡与坏死或死活的检测，适用于流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备。

7-AAD，英文全称为 7-aminoactinomycin D，中文名称叫做 7-氨基放线菌素 D，是一种能够嵌入核酸的荧光指示剂，形成的 DNA 复合物在 546nm 激发光下能够产生 647nm 的最大发射光，这一特性使其常用于多色荧光显微镜或流式细胞实验中。

7-AAD 和碘化丙啶(PI)类似，是一种非细胞膜渗透性的荧光染料，不能穿过具有生物活性的细胞质膜，因此被用来区分正常细胞与坏死细胞，也可以被用于细胞固定或通透后的核酸染色。与碘化丙啶(PI)不同的是，被 546nm 的氩离子激光激发后，7-AAD 的发射光谱较 PI 窄，且发射波长更长，对其它检测通道的干扰更小，在多色荧光分析中是 PI 的最佳替代品，可与多种 488 激发光激发的荧光染料联合使用，如 FITC (异硫氰酸荧光素)、PE (藻红蛋白)、APC (别藻蓝蛋白)、Calcein AM 等，在光谱的 600nm 左右有较弱的荧光，可用一般的荧光显微镜检测红色荧光，而在远红光 650nm 左右有较强的荧光，可用流式细胞仪 FL3 通道或配备 650nm 长通滤光片的荧光显微镜检测远红荧光。

7-AAD 的分子式为 $C_{62}H_{87}N_{13}O_{16}$ ，分子质量为 1270.45，CAS number 为 7240-37-1。染色 DNA 后的最大激发光波长为 546nm，最大发射光波长为 647nm。对于 96 孔板，按 1:20 配制 7-AAD 检测工作液，且每孔使用 100 μ l 7-AAD 检测工作液，此时本试剂盒 C 1053S 可进行 20-200 次检测。

产品信息

表 1.组成信息

产品名称	产品规格	储存条件	保质期
7-AAD 细胞活力检测试剂盒	20T/100T/200T	-20℃	12 个月

产品组成

产品名称	20T	100T	200T
7-AAD (20X)	100uL	500uL	1mL
检测缓冲液	5mL	25mL	50mL

使用说明

1. 染色工作液配制：

按照 96 孔板每孔 100 μ l 7-AAD 染色工作液的体系，按每 5 μ l 7-AAD (20X)加入 95 μ l 检测缓冲液的比例稀释 7-AAD，参考下表配制适量的 7-AAD 染色工作液，需充分混匀。

	1 个样品	10 个样品	100 个样品
7-AAD (20X)	5 μ l	50 μ l	0.5ml
检测缓冲液	95 μ l	950 μ l	9.5ml
7-AAD 染色工作液	100 μ l	1ml	10ml

注 1：为得到比较理想的结果，可根据细胞类型和实际情况对 7-AAD (20X)在 10-100 稀释倍数之间进行适当调整。

注 2：配制 7-AAD 染色工作液时注意避光，且须现配现用，不能长期保存。

注 3：也可以用其它合适的缓冲液，如无血清培养液、HBSS (C0218)或 PBS (C0221A/C0221D)稀释 7-AAD (20X)。

本试剂盒配套提供的检测缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果通常比 PBS 或 HBSS 更好。

2. 悬浮细胞染色：

a. 细胞准备。细胞按照实验设计进行一定处理后，计数。取适当细胞 600 $\times$ g 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 1×10^6 。

b. 染色。对于上一步骤的 1×10^6 个细胞的沉淀，加入 1ml 7-AAD 染色工作液，重悬为单

细胞悬液。37℃ 孵育细胞 5-15min，不同的细胞最佳孵育时间不同。以 5min 作为初始孵育时间，根据自己实验的细胞进行优化得到最佳的效果。注：需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照，该缓冲液与配制7-AAD 染色工作液的缓冲液宜保持一致。

c.检测。孵育结束后可直接使用流式细胞仪检测，或将细胞铺开于孔板、细胞培养皿或者细胞爬片上，在荧光显微镜下观察。7-AAD 插入 DNA 后的最大激发光波长为 546nm，最大发射光波长为647nm。注：在检测前，也可将细胞用PBS 洗涤2-3 次，最后用每个样品加入 0.5-1ml 检测缓冲液重悬细胞后用于检测，这样效果更好。

3.贴壁细胞的消化后染色：

a.细胞准备。把细胞培养液吸出至一合适离心管内，PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入适量胰酶细胞消化液(可含有 EDTA)消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时，吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。注意：对于贴壁细胞，胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，从而导致细胞坏死的假阳性；消化时间如果过长，同样易造成细胞膜损伤而出现细胞坏死的假阳性。

b.细胞合并：加入步骤3a 中收集的细胞培养液，把细胞轻轻吹打下来，转移到离心管内，600×g 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞，用 PBS 洗涤细胞一次，然后用PBS 重悬细胞并计数。注意：加入步骤3a 中的细胞培养液非常重要，一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞，另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。

c.染色和检测：方法同“悬浮细胞染色”的 2b-c。

4.贴壁细胞的原位荧光检测：

注：本方法的优点是可以原位观察细胞坏死，缺点是部分坏死细胞可能由于不贴壁而检测不到。

a.接种培养。将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。如果条件许可，在实验处理结束后，用可以对多孔板进行离心的离心机 1000×g 离心 5 分钟。

b.洗涤。吸去细胞培养液，使用PBS 洗涤细胞 1-2 遍。如果条件许可，每次在吸除 PBS 前 1000×g 离心 5 分钟。

c.染色：加入适当体积的染色工作液，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。37℃孵育细胞 5-15min，不同的细胞最佳培养时间不同。以 5min 作为初始孵育时间，根据自己实验的细胞进行优化得到最佳的效果。

d.检测：孵育结束后直接在荧光显微镜下观察。7-AAD 插入 DNA 后的最大激发光波长为 546nm，最大发射光波长为 647nm。注：在检测前，也可将细胞用PBS 洗涤 2-3 次，并在吸除 PBS 前 1000×g 离心 5 分钟，这样效果更好。

注意事项

1、配制成溶液后如果有细菌或真菌污染，可能会严重影响检测效果。7-AAD (20X)需要避光保存。

2、染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致坏死细胞的数量增加。

3、细胞经固定、通透和RNase 处理后也可以使用 7-AAD 检测细胞周期，但更常用的是碘化丙啶(PI)。

4、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

6、荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。